

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭63-210665

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup> 識別記号 庁内整理番号  
 G 01 N 33/573 Z-7906-2G  
 C 12 N 15/00 C-8412-4B  
 C 12 P 21/00 D-6712-4B  
 G 01 N 33/543 U-7906-2G  
 33/577 A-7906-2G  
 8318-4H  
 // C 07 K 15/04  
 (C 12 P 21/00  
 C 12 R 1:91)

⑭ 公開 昭和63年(1988)9月1日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全10頁)

⑮ 発明の名称 コラゲナーゼインヒビターの酵素免疫学的定量法

⑯ 特 願 昭62-42781

⑰ 出 願 昭62(1987)2月27日

⑱ 発 明 者 小 玉 修 嗣 富山県高岡市東下関3番14号  
 ⑲ 発 明 者 岩 田 和 士 富山県高岡市五十里東町190番地  
 ⑲ 発 明 者 来 住 準 一 愛知県名古屋市瑞穂区山下通り5丁目5番地 ライオンズ  
 マンション瑞穂公園4棟15号  
 ⑲ 発 明 者 早 川 太 郎 愛知県名古屋市天白区天白町平針大堤下1355番地  
 ⑳ 出 願 人 富士薬品工業株式会社 富山県高岡市長慶寺530番地  
 ㉑ 代 理 人 弁理士 南 孝 夫

## 明 細 書

1. 発明の名称 コラゲナーゼインヒビターの酵  
 素免疫学的定量法

## 2. 特許請求の範囲

ウシコラゲナーゼインヒビターの異なる抗原  
 決定基に対し、特異的に結合する2種類のモノ  
 クローナル抗体の組合せを用いてサンドイッチ  
 法により酵素免疫学的に測定することを特徴と  
 するウシコラゲナーゼインヒビターおよびヒト  
 コラゲナーゼインヒビターの定量法。

## 3. 発明の詳細な説明

本発明はヒト及びその他の動物の骨、皮膚、  
 歯髄、羊水、血液、慢性リウマチ関節液中及び  
 関節軟骨細胞、滑液細胞、各種組織由来線維芽  
 細胞、線維肉腫細胞培養液中のコラゲナーゼイ  
 ンヒビターを高感度に定量する方法に関するも  
 のである。さらに詳しくは、本発明は、ウシコ  
 ラゲナーゼインヒビター(タイシユ・インヒビ  
 ター・オブ・メタロプロテナーゼ: TIMP)に対  
 するモノクローナル抗体を用いるサンドイッチ

法に基づく酵素免疫学的測定法によるウシコラ  
 ゲナーゼインヒビターおよびヒトコラゲナーゼ  
 インヒビターの定量法を提供するものであつて、  
 固相担体に結合させる抗体及び酵素標識を付与  
 する抗体としてウシコラゲナーゼインヒビター  
 の異なる抗原決定基に対し特異的に結合する2  
 種類のモノクローナル抗体を用いることを特徴  
 とするものである。

従来、コラゲナーゼインヒビターを定量する  
 手段としては、その生物活性の測定による方法  
 が知られている。しかしながら、J. Lab. Clin.  
 Med. 75, 258 ~ 263 (1970) に Eisen らが記載して  
 いるように血清中や血漿中にはコラゲナーゼイ  
 ンヒビター活性の測定を妨害する蛋白質、例え  
 ば $\alpha_2$ -マクログロブリンが存在するため、その  
 ような場合にはコラゲナーゼインヒビター活性  
 を精確に測定することは実質上不可能である。  
 コラゲナーゼインヒビターを特異的に、精度よ  
 く、定量することができれば、コラゲナーゼイ  
 ンヒビター投与による疾病の治療の過程におけ

る血中のコラゲナーゼインヒビターの濃度の変動の測定(モニタリング)や医療用コラゲナーゼインヒビターの製造の際の原料中のコラゲナーゼインヒビターの含有量の解析あるいは製品におけるコラゲナーゼインヒビターの純度の測定などに極めて意義のあることとなる。

本発明者らは、ウシコラゲナーゼインヒビターに対するモノクローナル抗体を用い、サンドイッチ法に基づく酵素免疫学的測定法(BIA)を行うことにより少量の試料で精度よく、簡便、迅速にコラゲナーゼインヒビターを特異的に定量する方法を完成した。

すなわち、本発明は、固相単体に結合させる抗体及び酵素標識を付与する抗体としてウシコラゲナーゼインヒビターの異なる抗原決定基に対し、特異的に結合するモノクローナル抗体を用い、酵素免疫学的測定法によりウシコラゲナーゼインヒビターおよびヒトコラゲナーゼインヒビターを定量する方法を提供するものである。

本発明方法を行うにあつては、固相担体と

してポリスチレン製ビーズをはじめ、抗原や抗体を受動的に良く吸着するポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリビニール製のマイクロプレート、スライク、試験管など種々の担体を使用することができる。一方、酵素標識を付与する抗体としては、抗体含有物を緩安分画後、DEAE-Sepharcelの如き陰イオン交換ゲルにより精製したIgG画分、更にはペプシン消化後、還元して得られる特異的結合部分Fab'を用いることもできる。

本発明方法により、固相単体に結合させる抗体及び酵素標識を付与する抗体として、ウシコラゲナーゼインヒビターの異なる抗原決定基に対し、特異的に結合する2種類のモノクローナル抗体の組合せを用いて、固相法酵素免疫学的測定法によりウシコラゲナーゼインヒビターおよびヒトコラゲナーゼインヒビターを定量することができる。

以下実施例により本発明を具体的に説明する。ただし本発明はこれら実施例に限定されるもの

ではない。

#### 実施例 1

抗ウシコラゲナーゼインヒビターモノクローナル抗体の作製

##### (a) 抗原-ウシコラゲナーゼインヒビターの調製

J. Biochem. 96, 395 ~ 404 (1984)に記載の本発明者らの方法に従いウシ未萌出知歯の根歯歯髄をイーグルMEM培養地(日本製薬製)で培養した培養外液からCon A-セファロース、ウルトログルAcA 44およびDE-52セルロースの各カラムを用いてコラゲナーゼインヒビターを精製した。精製インヒビターはJ. Mol. Biol. 80, 579 ~ 599 (1973)に記載のLaemmliらの方法に従いドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)で調べたところ分子量約32,000ダルトン(D)の単一バンドを示した。

##### (b) 抗体産生細胞の調製

6週令のBalb/c雄マウス2匹をまずフロインド完全アジュバンド中で、前記(a)で記述した精

製ウシコラゲナーゼインヒビターで初回免疫する。マウスにそれぞれ48μgのウシコラゲナーゼインヒビターを0.4mlの溶液として腹腔内投与する。さらに30日目に生理食塩水に溶解した84μgのウシコラゲナーゼインヒビターを追加免疫する。最終免疫として58日目に腹腔内投与(95μg/500μl生理食塩水)により補助免疫し、3日後にマウス脾臓を取り出し、脾細胞を調製する。

##### (c) 細胞融合

###### (i) 以下の材料および方法を用いる。

RPMI 1640培養地: RPMI 1640 (Difco Laboratories)に重炭酸ナトリウム(12mM)、ピルビン酸ナトリウム(1mM)、L-グルタミン(2mM)、ペニシリンGカリウム(50U/ml)、硫酸ストレプトマイシン(50μg/ml)、および硫酸アミカシン(100μg/ml)を加え、ドライアイスでpHを7.2にし、0.2μm東洋メンブレンフィルターで除菌伊通する。

N8-1培養地: 上記RPMI 1640培養地に除菌伊通した

仔牛胎児血清(M.A.Bioproducts)を15% (v/v)の濃度に加える。

PEO 4000 溶液: RPMI 1640 培地のポリエチレングリコール 4000 (PEO 4000, Merck & CO., Inc.) 50% (w/w) 無血清溶液を調製する。

8-アザデアニン耐性ミエローマ細胞 NS-1 (23-NS1-1) との融合は Selected Method in Cellular Immunology (ed. B.B. Mishell and S.M. Shligi), W. H. Freeman and Company (1980), 351 ~ 372 に記載の 01 の方法を若干改変して行つた。

(2) 前記(b)で調製した有核脾臓細胞(生細胞率100%)とミエローマ細胞(生細胞率100%)とを5:1の割合で融合する。脾臓細胞とミエローマ細胞とを別に前記の RPMI 1640 培地で洗滌する。次に同じ培地にけん濁し、融合させるため上記の割合で混合する。容量50 ml の円錐形スチロール樹脂製試験管(Iwaki Glass)を用い、40 ml の RPMI 1640 培地中  $400 \times g$ 、10分間遠心し、上清を完全に吸出する。沈殿細胞に37℃加温 PEO 4000 溶液 1.3 ml を穏やかに撹拌し

ながら1分間で滴下し、さらに1分間撹拌し細胞を再けん濁、分散させる。次に37℃加温 RPMI 1640 培地 1.3 ml を1分間で滴下する。この操作をさらに1回繰返した後、同培地 9 ml を2~3分間で常に撹拌しながら滴下し細胞を分散させる。これを  $400 \times g$ 、10分間遠心分離し、上清を完全に吸引除去する。次にこの沈殿細胞に37℃加温 NS-1 培地 12.9 ml をすみやかに加え、細胞の大きい塊りを10 ml のピペットを用いて注意深くピペッティングして分散する。さらに同培地 2.6 ml を加えて希釈し、ポリスチレン製96穴マイクロウエル(Iwaki Glass)にウエル当り  $6.0 \times 10^5$  個/0.1 ml の細胞を加える。なお、この時使用する96穴マイクロウエルは前処理として0.2 ml の NS-1 培地を加え、炭酸ガス培養器中(37℃)で一晩保温し、使用時に培地を吸引除去しておく。細胞を加えた上記のマイクロウエルを7%炭酸ガス/93%空気中で温度37℃、湿度100%下に培養に付する。

(d) 選択培地によるハイブリドーマの選択的増

#### 殖

(1) 使用する培地は以下のとおりである。

HAT 培地: 前記(c)で述べた NS-1 培地にさらにヒポキサンチン(100  $\mu$ M)、アミノプテリン(0.4  $\mu$ M)、およびチミジン(16  $\mu$ M)を加える。

HT 培地: アミノプテリンを除去した以外は上記 HAT 培地と同一組成のものである。

(2) 前記(c)の培養開始後翌日(1日目)、細胞にパスツールピペットで HAT 培地 2 滴(約0.1 ml)を加える。2、3、5、8、11日目に培地の半分(0.1 ml)を新しい HAT 培地で置き換え、14日目に培地の半分を新しい HT 培地で置き換える。以降3~4日毎に培地の半分を新しい HT 培地で置き換える。通常2~3週間で充分なハイブリドーマの生育が観察される。ハイブリドーマ生育全ウエルについて次項(e)記載の固相-抗体結合テスト法(ELISA)により陽性ウエルをチェックする。次にフィーダーとして  $10^7$  個のマウス胸腺細胞を含む HT 培地 1 ml をポリスチレン製24穴セルウエル(Iwaki Glass)に加えたものを用い、

上記で検出された各陽性ハイブリドーマの全内容物を移す。これを前記(c)におけると同様に7%炭酸ガス存在下、37℃で約1週間培養に付する。その間1~2回各ウエルの上清0.5 ml を新しい HT 培地0.5 ml と交換する。ハイブリドーマの充分生育した時点で ELISA 法により陽性を再確認し、それぞれについて次項(f)記載の限界希釈法によるクローニングを行う。なお、クローニングに使用後の残液をポリスチレン製25  $cm^3$  組織培養フラスコ(Iwaki Glass)に移し、凍結保存用試料を調製する。

(e) 固相-抗体結合テスト(ELISA)による抗ウシコラゲナーゼインヒビター抗体産生ハイブリドーマの検索

Anal. Biochem. 104, 205 ~ 214 (1980) に記載の Rennard らの方法を若干改変した方法を用いる。この方法は、ハイブリドーマ抗体の検出に適している。96穴マイクロタイトレーションプレート(Flow Laboratories, Inc.)を0.5~1.0  $\mu$ g のウシコラゲナーゼインヒビターでコートし、次に、

未コート部分を1%牛血清アルブミン(BSA)でブロックする。これに前記(d)で得られたハイブリドーマ生育ウエルの上清の一部を加えて室温で約1時間インキュベートする。2次抗体として西洋わさびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスイムノグロブリン(cappel Lab.)を加え、さらに室温で約1時間インキュベートする。次に過酸化水素と基質であるo-フェニレンジアミンを加え生成した褐色の程度を肉眼で定性的に判定するか、あるいはコロナ2波長マイクロプレート光度計(MTP-22、コロナ電気社)を用いて500 nmの吸光度を測定する。

#### (f) クローニング

前記(d)の操作後、各ウエル中には2種以上のハイブリドーマが生育している可能性があるので、限界希釈法によりクローニングを行い、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを取得する。NS-1培地40μl当たりフィーダーとして $10^7$ 個のマウス脾臓細胞を含むクローニング培地を調製し、96穴マイクロウエルの36ウエル、36

は10~100 μg/μlである)。一方、大量に抗体を得るためには脾細胞とミエロマ細胞の由来動物と同系の動物(Balb/c、マウス)に腫瘍形成促進剤プリスタン(2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン、Aldrich Chemical社)をマウス一匹当たり0.5 μl腹腔内投与し、1~3週間後、各ハイブリドーマ $1 \times 10^7$ 個を同じく腹腔内投与することにより生体内で、さらに、1~2週間後、モノクローナル抗体たん白質濃度4~7 mg/μlの腹水を得ることができる。

#### (h) モノクローナル抗体の重鎖、軽鎖及びアイソタイプ

前記(g)で得られた各々の腹水を先ずウシコラゲナーゼインヒビターをコートしたマイクロタイトレーションプレートに前述したELISA法に従って結合させる。PBSによる洗滌後次に、アイソタイプ特異性ウサギ抗マウスIg抗体(Zymed Laboratories)を加える。PBSによる洗滌後、西洋わさびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG(H+L)抗体を加え、基質として2,2'-アジノ

ウエルおよび24ウエルにウエル当たり5個、1個および0.5個のハイブリドーマを加える。5日目、12日目に全ウエルに各約0.1 μlのNS-1培地を追加する。クローニング開始後14~15日で充分なハイブリドーマの生育が認められ、コロニー形成陽性ウエルが50個以上である群についてELISA法を行う。テストした全ウエルが陽性でない場合、抗体陽性ウエル中のコロニー数を確認し、ウエル中に1コロニーが確認されたウエルを4~6個選り再クローニングする。最終的にウシコラゲナーゼインヒビターに対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ17株が得られた。

#### (g) モノクローナル抗体の生体外増殖および生体内増殖

モノクローナル抗体の増殖は常法による。すなわち、モノクローナル抗体は、得られた各ハイブリドーマをNS-1培地などの適当な培養液で培養(生体外増殖)し、その培養上清から得ることができる(モノクローナル抗体たん白質濃度

0.3~3-エチルベンゾチアゾリン硫酸-6)および過酸化水素を用いて検出した。その結果をまとめて後掲の第1表に示した。得られたウシコラゲナーゼインヒビターに対するモノクローナル抗体の内15個が免疫グロブリン鎖 $\gamma 1/\kappa$ を、1個が $\gamma 2a/\kappa$ を、そして、1個が $\gamma 2b/\kappa$ を有していた。

#### (i) モノクローナル抗体の精製

前記(g)で得られた各腹水を硫酸分画(40%飽和)後、塩化ナトリウム0.06Mを含む40mMリン酸緩衝液、pH 8.0で平衡化したDEAE-Sephacel(pharmacia社)の非吸着画分を分取し、このIgG画分を更に0.42M塩化ナトリウムを含む50mMリン酸緩衝液、pH 7.4で平衡化したSephacryl S-300 Superfine(Pharmacia社)カラムでゲル濾過し、培地中のFCBおよびマウス由来のたん白質を分離、除去した。

#### 実施例 2

ウシ歯髄コラゲナーゼインヒビターとモノクローナル抗体との交叉性

(a) 酵素標識モノクローナル抗体 (Fab'-POD 複合体) の調製法

(1) Fab' 画分の調製

実施例 1 (1) で得られた IgG 画分を 0.1 M 塩化ナトリウム含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 4.2) に溶解し、その溶液を以下述べるようにしてペプシンで消化した。すなわち、前記画分中の IgG に対し 2.2 倍 (w/w) のペプシンを加え、37℃、24 時間消化した。更にその消化物に 2 M トリス溶液を加えて pH を 7.0 に調整することにより消化反応を停止させ、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したウルトロゲル AcA 44 カラム (LKB 製) を用いたゲル透過により F(ab')<sub>2</sub> 画分を分取した。

次に、この F(ab')<sub>2</sub> 画分をエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で透析し、終濃度 1.0 mM となるようにアミノエタントール (MEA) を加え 37℃ で 15 時間還元した後、5 mM EDTA 含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化したウルトロゲル AcA 44

M リン酸緩衝液 (pH 6.0) で希釈した。この混合液を 4℃、20 時間反応後、Fab' の 1.0 倍モル量の N-エチルマレイミドで未反応のチオール基をブロックした。これを 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) で平衡化したウルトロゲル AcA 44 カラムでゲル透過し、Fab'-POD 複合体画分を分取後、0.1 % 牛血清アルブミン (BSA) 及び 0.005 % テメロサールを添加し、4℃ で保存した。

(b) ウェスタンブロッティング

実施例 1 (a) 項で精製したウシ歯髄コラゲナーゼインヒビターを SDS - PAGE に供した後、市販の POD 標識ヤギ抗マウス免疫グロブリンおよび上記実施例 2 (a) で得られた Fab'-POD 複合体を用いて細胞工学 1 & 2、1061 ~ 1068 (1983) に記載の田部の方法に従ってウェスタンブロッティングを行い、酵素抗体染色のパターンを得た。これを第 1 図に示す。第 1 図において、A 及び B はウェスタンブロッティング後のニトロセルロース膜をそれぞれ実施例 2 (a) で得られた Fab' (クローン 7-3F1) - POD 複合体及び Fab' (ク

ローム 7-21B12) - POD 複合体で免疫染色した結果を示すものである。

(2) マレイミド標識 POD 画分の調製

上記 (1) の操作とは別に、以下述べるようにして西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (POD) にマレイミドを標識した。すなわち、POD を 10 mg/ml の量で 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、その POD に対して、2.5 倍モル量の N-(ε-マレイミドカプロイルオキシ) コハク酸イミド (EMCS) をジメチルホルムアミド溶液として加え、30℃、30 分間反応させた。これを 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化したセフアデックス O-50 カラムでゲル透過し、マレイミド標識 POD 画分を分取した。

(3) Fab' - POD 複合体画分の調製

上記 (1) の如くして調製した画分中の Fab' に対して上記 (2) で得られた画分中のマレイミド標識 POD として等モルになるようにして、両画分を混合し、更に Fab' およびマレイミド標識 POD の終濃度が 1.00 mM となるように 5 mM EDTA 含有 0.1

M リン酸緩衝液 (pH 6.0) で希釈した。この混合液を 4℃、20 時間反応後、Fab' の 1.0 倍モル量の N-エチルマレイミドで未反応のチオール基をブロックした。これを 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) で平衡化したウルトロゲル AcA 44 カラムでゲル透過し、Fab'-POD 複合体画分を分取後、0.1 % 牛血清アルブミン (BSA) 及び 0.005 % テメロサールを添加し、4℃ で保存した。

また、1 ~ 16 は下記の各モノクローナル抗体 (いずれも IgG タイプ) の溶液にウエスタンブロッティング後のニトロセルロース膜を浸した後、あらためて各ニトロセルロース膜を POD 標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン (Cappel Laboratories 製) で免疫染色した結果を示すものである。

1 : クローン 7-3F1、2 : クローン 7-4F2、3 : クローン 7-5A1、4 : クローン 7-6C1、5 : クローン 7-7F11、6 : クローン 7-8B2、7 : クローン 7-9B4、8 : クローン 7-10B11、9 : クローン 7-11A5、10 : クローン 7-12B6、11 : クローン 7-15B8、12 : クローン 7-18F3、13 : クローン 7-19F6、14 : クローン 7-20C2、15 : クローン 7-21B12、16 : クローン 7-23O9

第 1 図に示されるところから明らかなように、上記のモノクローナル抗体は、いずれもウシ歯髄コラゲナーゼインヒビターと交叉することが

わかつた。

### 実施例 3

#### サンドイッチ酵素免疫測定法

##### (a) モノクローナル抗体結合ボールの調製法

J. Immunoassay 4, 209 ~ 327 (1983) に記載の石川らの方法に従つて実施例 1 (1) で得られたモノクローナル抗体を 0.1 M アジ化ナトリウム含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解し、それを 100  $\mu$ g/ml ( $A_{280}=0.15$ ) の濃度に調整した後、そのモノクローナル抗体溶液にポリスチレンボール (径 5  $\mu$ m, Precision Plastic Ball 製) を浸漬し、4  $^{\circ}$ C に 24 時間静置した。次にモノクローナル抗体溶液を除去した後、0.1 M BSA、0.1 M 塩化ナトリウム及び 0.1 M アジ化ナトリウム含有 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) (以下緩衝液 A と略記する) で 5 回洗浄した後、緩衝液 A に浸し、4  $^{\circ}$ C で保存した。

##### (b) サンドイッチ測定法

精製したコラゲナーゼインヒビター溶液、あるいはコラゲナーゼインヒビターを含む試料溶

#### 選択

コラゲナーゼインヒビターを定量することが可能なモノクローナル抗体の組合せを探す目的で実施例 1 (1) の方法で調製したクローン 7-3F1、7-6C1、7-19F6 及び 7-21B12 の各モノクローナル抗体から Fab'-POD 複合体を調製した。一方、クローン 7-3F1、7-4F2、7-5A1、7-6C1、7-7F11、7-8B2、7-9B4、7-10B11、7-11A5、7-12B6、7-15B8、7-18F3、7-19F6、7-20C2、7-21B12、及び 7-2309 の各モノクローナル抗体を固相として、試験管当たり 1 ng の精製したウシ歯髄コラゲナーゼインヒビターを用いて実施例 3 (b) の方法によりサンドイッチ定量を行つた。得られた  $A_{450}$  値を第 2 表 (後掲) に示す。

なお、第 2 表中の  $A_{450}$  値は試料 1 ng 添加の値からコラゲナーゼインヒビターを添加しない時の値を差し引いた数値である。上記 4 種類のいずれの Fab'-POD 複合体を用いた場合においても、固相として 7-4F2、7-11A5、7-12B6、7-18F3、7-20C2、及び 7-2309 の 6 種類の抗体を用いた時

液を 1 M BSA を含む緩衝液 A で希釈し、各試験管に 300  $\mu$ l 加えた。次に前記 (a) 項で調製した抗体結合ボールを加え、37  $^{\circ}$ C で 1 時間振とう加温後 (第 1 反応)、0.1 M 塩化ナトリウム含有 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 3  $\mu$ l で各試験管を 3 回洗浄した。次に実施例 2 (a) 項で調製した Fab'-POD 複合体を 20 ng/試験管となるように 0.1 M BSA 及び 0.1 M 塩化ナトリウム含有 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で希釈し 30  $^{\circ}$ C で 1 時間振とう加温した (第 2 反応)。反応終了後、第 1 反応終了時と同様に洗浄した。次に 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) に溶解した POD 基質、すなわち 0.0134 M テトラメチルベンチジン (TMBZ) を 0.3  $\mu$ l 加え、更に 0.01 M 過酸化水素 0.1  $\mu$ l を加えて 30  $^{\circ}$ C で 1 時間振とう加温 (第 3 反応) 後、1.33 N 硫酸 0.6  $\mu$ l を添加することにより反応を停止させた。その反応混濁液の  $A_{450}$  値を分光光度計で測定し、標準直線より試料中のコラゲナーゼインヒビター量を求めた。

##### (c) サンドイッチ測定用モノクローナル抗体の

の  $A_{450}$  が 2 以上の値を示した。次にこれら 24 通りの組合せについて、ウシ歯髄コラゲナーゼインヒビターの添加量を変えてサンドイッチ定量を行つた。Fab' (クローン 7-3F1)-POD を複合体とし、クローン 7-4F2 抗体を固相とした場合に得られた結果を第 2 図に示す。第 2 図に見られるように、添加したウシ歯髄コラゲナーゼインヒビター量と  $A_{450}$  の間に直線関係が成立し、定量感度は試験管当たり約 0.6 pg (19a mc1) であつた。上記以外の組合せについても上記の直線関係が見られ、いずれの組合せについてもサンドイッチ定量が可能であることがわかつた。

### 実施例 4

血清中あるいは血漿中のコラゲナーゼインヒビターの同定

##### (a) アフィニティカラムの調製

Nature 214, 1302 ~ 1304 (1967) に記載の Axénら及び Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 61, 636 ~ 643 (1968) に記載の Cuatrecasasらの方法に従つて具化シアンを介して担体のセファロース 4B にリガ

ンドとして実施例1(a)で得られた精製モノクローナル抗体を固定化した。次に抗体結合セフアロース4Bゲル2.3mlをガラス管に充填し、0.1M塩化ナトリウム及び5mM塩化カルシウム含有30mMトリス-塩酸緩衝液で平衡化し使用した。

(d) コラゲナーゼインヒビターのアフィニティ

#### 精製

健康人血清及び天疱瘡患者血漿、ならびにウシ血清各1mlを0.1M塩化ナトリウム及び5mM塩化カルシウム含有30mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)に対して透析した後、上記(a)項記載の方法に従って調製したクローン7-21B12抗体結合セフアロース4Bカラムに供し、上記緩衝液で洗浄し(非吸着画分)、次にカラムを2M塩化ナトリウム含有30mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)及び0.5M塩化ナトリウム含有0.2Mグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液(pH11.0)で順次洗浄し(洗浄画分)、最後にカラムに吸着した蛋白質を0.2Mグリシン-塩酸緩衝液(pH2.0)で溶出した(溶出画分)。後掲の第3表

ビターのそれと同じ32,000Dであることがわかった。

(b) サンドイッチ測定法によるウシ血清中及びヒト血清中のコラゲナーゼインヒビターの定量

実施例3(c)項に示したモノクローナル抗体の組合せについてサンドイッチ定量を行い、ウシ血清中及びヒト血清中のコラゲナーゼインヒビター量を測定した。その結果を第4表(後掲)に示す。

なお、このサンドイッチ定量において、標準直線の作製には抗原として実施例1(a)項で精製したウシ歯髄コラゲナーゼインヒビターを用い、また、血清を測定する場合に1%BSAを含む緩衝液Aで1000倍、2000倍、4000倍及び8000倍にそれぞれ希釈してサンドイッチ定量を行い、それらの平均値を第4表中に示した。ウシ血清の場合、測定に供したいずれの組合せについても血清中のコラゲナーゼインヒビターを定量でき、それらの平均値は血清1ml当たり

に示した如く健康人血清(ヒト血清)、天疱瘡患者血漿及びウシ血清を用いた時の溶出画分にそれぞれ2.0、1.8及び7.1μgの蛋白質がられた。なお、これらの溶出画分をSDS-PAAGEに供したところ、多数のバンドが認められた。これらのバンドのうち、コラゲナーゼインヒビターに相当するバンドを画定するためウエスタンブロッティングを行った。その結果を第3図に示す。第3図に示したように、A:健康人血清、B:天疱瘡患者血漿及びC:ウシ血清を用いて得られた溶出画分をSDS-PAAGEに供した後、1:クローン7-3F1、2:クローン7-6C1、3:7-19F6及び4:7-21B12の各モノクローナル抗体から調製したPab'-POD複合体を用いてウエスタンブロッティングを行った結果、いずれの血清中及び血漿中にもウシ歯髄コラゲナーゼインヒビターに対するモノクローナル抗体と反応するコラゲナーゼインヒビターが存在することがわかった。しかも、それらの分子量はいずれも実施例1(a)項で得られたウシ歯髄コラゲナーゼインヒ

2.8μgであつた。一方、ヒト血清の場合、測定に供したほとんどの組合せでA<sub>450</sub>は全く検出されなかつたが、固相用抗体としてクローン7-2309抗体、複合体としてPab'(クローン7-6C1)-PODを用いた場合、サンドイッチ定量可能であることがわかった。

次に上記の組合せを用いて、健康人血清(ヒト血清)5検体、肝臓癌患者血清2検体及び天疱瘡患者血漿2検体の中に存在するコラゲナーゼインヒビターをサンドイッチ定量した。その結果を第5表(後掲)に示す。第5表に示したように、健康人血清1ml中に存在するコラゲナーゼインヒビター量は平均0.29μgであり、ウシ血清中のその量とほぼ同じ値を示した。また、天疱瘡患者血漿中のコラゲナーゼインヒビターの量は健康人血清中のそれに比べて約1/3と明らかに少ないことがわかった。

第 1 表

クローン番号	サブクラス/鎖
7-3P1	IgO1/ε
7-4P2	IgO1/ε
7-5A1	IgO1/ε
7-6C1	IgO1/ε
7-7P11	IgO1/ε
7-8B2	IgO2a/ε
7-9B4	IgO1/ε
7-10B11	IgO1/ε
7-11A5	IgO1/ε
7-12B6	IgO1/ε
7-14B9	IgO1/ε
7-15B8	IgO1/ε
7-18P3	IgO2b/ε
7-19P6	IgO1/ε
7-20C2	IgO1/ε
7-21B12	IgO1/ε
7-2309	IgO1/ε

第 2 表

細胞用抗体	Pab'-PQD 複合体		
	IgO1(7-3P1)	IgO1(7-6C1)	IgO1(7-21B12)
IgO1(7-3P1)	0.011	3.989	2.252
IgO1(7-4P2)	3.144	4.811	3.354
IgO1(7-5A1)	3.257	0.010	0
IgO1(7-6C1)	2.152	0.001	0.011
IgO1(7-7P11)	0.125	0.239	0.102
IgO2a(7-8B2)	0	3.967	1.064
IgO1(7-9B4)	0.196	0.057	0.029
IgO1(7-10B11)	0.891	0.007	0.001
IgO1(7-11A5)	3.406	4.455	3.288
IgO1(7-12B6)	3.604	4.083	2.952
IgO1(7-15B8)	0.513	0.781	0.387
IgO2b(7-18P3)	3.362	4.735	3.114
IgO1(7-19P6)	1.066	0	0
IgO1(7-20C2)	3.277	4.553	3.240
IgO1(7-21B12)	2.107	0.002	0.003
IgO1(7-2309)	3.622	4.386	3.027

第 3 表

	蛋白質量 (μg/血清 1 ml)	
	ヒト血清	マウス血清 (天線)
カラム加減	64.000	34.700
赤血球成分	60.700	34.700
血清成分	2.0	2.6
抽出成分	2.0	1.8
		2.13
		7.1

第 4 表

細胞用抗体	Pab'-PQD 複合体					
	IgO1(7-3P1)	IgO1(7-6C1)	IgO1(7-19P6)	IgO1(7-21B12)	IgO1(7-21B12)	IgO1(7-21B12)
IgO1(7-4P2)	0.28	0	0.24	0	0.25	0
IgO1(7-11A5)	0.27	0	-	-	-	0.30
IgO1(7-12B6)	0.29	0	-	-	-	0.36
IgO2b(7-18P3)	0.28	0	-	-	-	0.25
IgO1(7-20C2)	0.28	0	-	-	-	0.21
IgO1(7-2309)	-	-	0.51	0.29	0.24	0
平	0.28	0.28	0.25	0.24	0.24	0.28

第 5 表

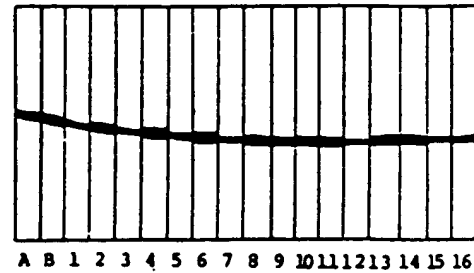
マウス・インヒビター (μg/ml)	
ヒト血清	ヒト血清 (天線)
0.20	0.52
0.27	0.52
0.29(0.29±0.06)	0.10
0.33	0.12
0.38	



## 4. 図面の簡単な説明

第1図はウシ歯髄コラゲナーゼインヒビターをSDS-PAOGに供した後、種々のモノクローナル抗体を用いた時のウエスタンブロッティングパターンを示す図であり、第2図は図相7-4P2抗体-複合体Fab'(7-3P1)-POD測定系でのウシ歯髄コラゲナーゼインヒビターの標準直線を示す図であり、第3図は(A)ヒト血清(健康人)、(B)天疱瘡患者血漿及び(C)ウシ血清をそれぞれモノクローナル抗体(7-21B12)結合セフアロース4Bカラムからの溶出画分のウエスタンブロッティングパターンを示す図である。

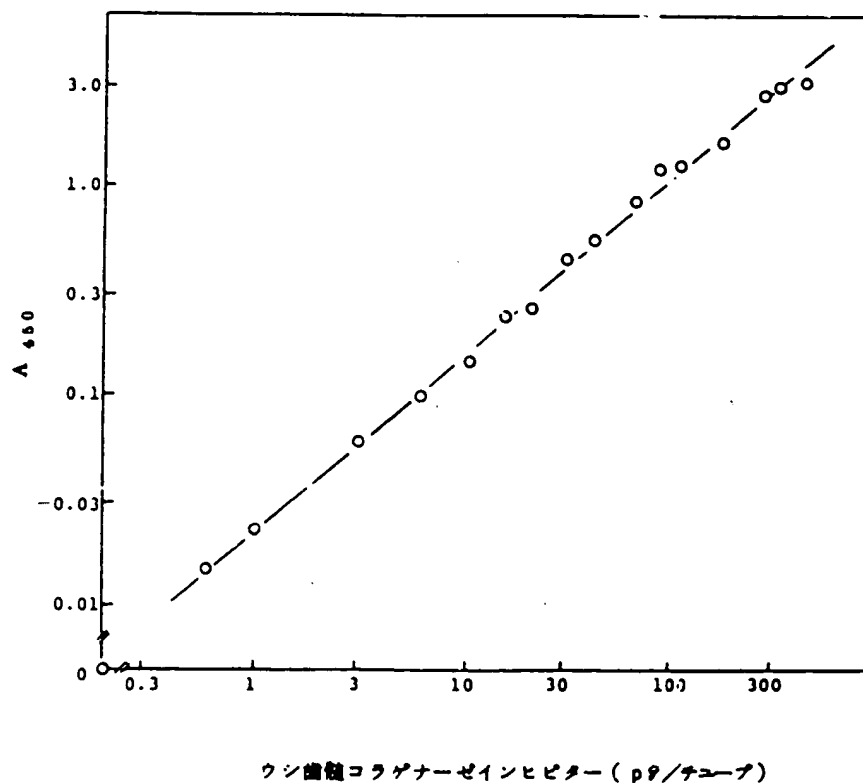
第 1 図



特許出願人 富士薬品工業株式会社

代理人 弁理士 南 孝 夫

第 2 図



第 3 図

